

# 下部尿路閉塞ラット膀胱における SDF1 $\alpha$ 遺伝子発現と 骨髄由来ストローマ細胞遊走の関連性

## 学位論文内容の要旨

### 緒言

近年、再生医療の新たな手法として、ES 細胞や骨髄由来間葉系幹細胞を用いた細胞療法が注目されている。骨髄由来間葉系幹細胞は多分化能を有し、平滑筋細胞や神経細胞など様々な細胞に分化し、臓器の障害を修復しその機能を回復することが確認されている。実際、骨髄間葉系幹細胞を利用した細胞療法の有用性は、心筋梗塞や脳梗塞、脊髄損傷モデルなどで数多く報告され、心筋梗塞ではヒトでの臨床応用も既に試みられている。しかし、泌尿器科領域への骨髄由来間葉系幹細胞を用いた細胞療法の報告はまだない。

一方、細胞療法による再生医療において、障害臓器や組織に細胞を遊走し接着させる機構の解明は重要な位置を占める。ケモカインのひとつである Stromal cell-derived factor1 $\alpha$  (SDF1 $\alpha$  [CXCL12]) は、組織に虚血が起こった際に誘導される Hypoxia inducible factor1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) により刺激されるが、骨髄細胞に発現する CXCR4 レセプターと結合することにより虚血組織への骨髄細胞の遊走・接着を制御し、組織修復に関与することが知られている。膀胱においても同様のメカニズムが働いていることが推察されるものの、膀胱組織での SDF1 $\alpha$  の発現を検討した報告はいまだなく、障害膀胱での SDF1 $\alpha$  の変化も未知である。さらに障害膀胱の修復過程において、骨髄由来細胞が形態的・機能的にどのように関与するかについても全く解明されていない。

今回の研究では、膀胱障害モデルとして下部尿路閉塞 (以下 B00) 膀胱を作成し、B00 膀胱における SDF1 $\alpha$  発現、B00 膀胱への骨髄由来ストローマ (以下 MDS) 細胞の遊走・生着機構、B00 後の膀胱リモデリング過程における MDS 細胞の関与について検討した。

### 材料及び方法

#### 実験 1 正常膀胱への Recombinant SDF1 $\alpha$ 蛋白注入による MDS 細胞遊走性の検討

正常雌 SD ラットの膀胱に Recombinant murine SDF1 $\alpha$  蛋白 (8 $\mu$ g/kg) または生食を注入し、GFP トランスジェニックラットより採取・培養した MDS 細胞 (3 $\times$ 10<sup>7</sup> 個) を経静脈的に投与した (各=3)。12 時間後に膀胱組織を採取し、抗 GFP 抗体と平滑筋のマーカーである抗  $\alpha$ SMA 抗体による蛍光免疫染色を用いて、共焦点顕微鏡にて観察した。

#### 実験 2 下部尿路閉塞 (B00) 膀胱における HIF1 $\alpha$ -mRNA, SDF1 $\alpha$ -mRNA 発現の検討

雌 SD ラットの膀胱頸部に metal rod をあてがい、3-0 絹糸にて尿道と metal rod を結紮した後 metal rod を取り除き、B00 膀胱モデルを作成。偽手術では、尿道を剥離し 3-0 絹糸を通すも結紮せず閉創。偽手術後 1 日目 (n=5) および B00 作成後 1、3、7、10、14 日目 (各 n=5) に膀胱組織を採取し膀胱重量を測定した後に、RNA を抽出し real-time RT-PCR

法により虚血のマーカーであるHIF1 $\alpha$ -mRNAとSDF1 $\alpha$ -mRNAを測定した。各遺伝子の発現は、Ribosomal 18SrRNA (rS18)を内部標準遺伝子とし、Sham群の遺伝子発現量を1とした時の各群の相対値を実験結果とした。結果は平均 $\pm$ 標準誤差で表し、有意差検定にはMann-Whitney's U testを用い、 $p < 0.05$ をもって統計学的に有意とした。

### 実験3 B00膀胱におけるMDS細胞遊走性の検討

雌SDラットにB00作成または偽手術施行と同時に、GFPトランスジェニックラットより採取・培養したMDS細胞( $5 \times 10^6$ 個)を経静脈的に投与(各  $n=3$ )。1および14日目にそれぞれ膀胱組織を抗GFP抗体と平滑筋のマーカーである抗 $\alpha$ SMA抗体による蛍光免疫染色を用いて、共焦点顕微鏡にて観察した。

## 結果

実験1：生食を注入した群ではMDS細胞の膀胱への遊走は全く認めなかったが、正常膀胱にRecombinant SDF1 $\alpha$ 蛋白を注入した群ではGFPでラベルされたMDS細胞が膀胱に遊走していた。MDS細胞は主に膀胱の粘膜下に存在していた。

実験2：B00膀胱では、正常膀胱に比べ膀胱重量は経時的に有意に増加していた。HIF1 $\alpha$ -mRNAは、B00作成後1日目において増加を認めたがその後3日目以降には減少を認めた。SDF1 $\alpha$ -mRNAは、B00作成後1日目に有意に増加していたが、その後3日目には減少を認め、14日目には再び増加していた。

実験3：B00作成直後にMDS細胞を投与したラットでは、投与1日目にはGFP陽性MDS細胞の膀胱への遊走を認め、その多くは膀胱粘膜下間質に存在した。14日目においても膀胱壁内にMDS細胞の生着を認め、また筋層に存在するMDS細胞の一部に平滑筋への分化を認めた。

## 結論

B00膀胱のリモデリング過程において、虚血により誘導されたSDF1 $\alpha$ が膀胱組織への骨髓由来ストローマ細胞の遊走・生着に関与していると考えられた。これらの機序の解明・制御は、B00における下部尿路機能障害の新たな治療法の端緒となる可能性があると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也  
副 査 教 授 清 水 宏  
副 査 教 授 岩 永 敏 彦

学 位 論 文 題 名

## 下部尿路閉塞ラット膀胱における SDF1 $\alpha$ 遺伝子発現と 骨髄由来ストローマ細胞遊走の関連性

骨髄由来間葉系幹細胞は、*in vitro* で増殖能力を維持し、多分化能を持つことが知られている。その性質を利用して障害臓器の修復・再生に役立てる細胞療法への応用が期待されている。細胞療法による再生医療において、障害臓器や組織に細胞を遊走し生着させる機構の解明は重要である。骨髄由来間葉系幹細胞の虚血組織への遊走・生着が起こる機序として、組織の低酸素状態により虚血のマーカーHypoxia-inducible factor1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) が誘導され、ケモカインのひとつである Stromal cell-derived factor1 $\alpha$  (SDF1 $\alpha$  [CXCL12]) を刺激し、SDF1 $\alpha$  が骨髄由来間葉系幹細胞に発現する CXCR4 レセプターと結合する経路が提唱されている。この論文では、下部尿路閉塞（以下 B00）膀胱におけるケモカイン SDF1 $\alpha$  の発現と骨髄由来ストローマ（以下 MDS）細胞遊走の関連性を検討し、経静脈的に投与した MDS 細胞が SDF1 $\alpha$  蛋白により正常膀胱組織に遊走すること、B00 膀胱では HIF1 $\alpha$ -mRNA, SDF1 $\alpha$ -mRNA が上昇すること、B00 膀胱に経静脈的に投与した MDS 細胞が遊走し、一部は平滑筋様の細胞に分化することが報告された。

質疑応答では副査の岩永敏彦教授から、遊走 MDS 細胞の膀胱以外の臓器への生着の有無、B00 膀胱の重量増加に対する遊走 MDS 細胞の寄与する割合について質問があった。これらの質問に対し申請者は、遊走 MDS 細胞の膀胱以外への生着については、肝・肺・小腸・腎臓には MDS 細胞の遊走は全く見られなかったが、脾臓には多くの MDS 細胞の生着が見られたことを解答した。また、B00 膀胱の重量増加に対する遊走 MDS 細胞の寄与については、組織像の結果からの推測にて MDS 細胞の割合は 5% 以下であり、膀胱平滑筋の肥大が主に膀胱重量の増加に寄与していると解答した。次いで、副査の清水 宏教授から、MDS 細胞の抗 GFP 抗体による染色について、MDS 細胞ではなく全骨髄成分を経静脈的に投与した場合について、MDS 細胞の遊走が見られた膀胱組織の H-E 染色について、MDS 細胞の平滑筋以外の成分への分化について質問があった。これらの質問に対し申請者は、膀胱組織を直接観察しても GFP 蛍光によって光る MDS 細胞を同定できるもののそのシグナルは非常に弱く、

抗 GFP 抗体にて染色した方がより鮮明に MDS 細胞を同定できたことを解答した。また、全骨髄液中における MDS 細胞の割合は本来少ないため、今回のように MDS 細胞を培養した方がその数を大幅に増やすことができ効果的な臨床応用に適していることを解答した。MDS 細胞の遊走が見られた膀胱組織を H-E 染色にて観察しても、MDS 細胞を区別することはできないこと、MDS 細胞の血管内皮への分化はみられなかったことを解答した。清水教授より、平滑筋だけでなく他の組織成分に分化することも総合評価できれば臨床応用への効果が一層期待できるとのコメントがあった。最後に、主査の野々村教授から、MDS 細胞の膀胱への遊走をブロックする方法について、障害された膀胱組織を再生医学的に改善する方法について、より効果的に MDS 細胞を生着させる方法について質問があった。これらの質問に対し申請者は、膀胱への MDS 細胞の遊走をブロックする方法として、siRNA にて SDF1  $\alpha$  を mRNA レベルで silencing する方法、CXCR4 レセプターをブロックする方法が有用である可能性を解答した。また、障害膀胱を組織学的に改善するためには、膀胱組織の線維化を改善することが重要と考えられ、b-FGF を徐放させる研究を引用し、その方法と MDS 細胞投与を組み合わせることが有用である可能性を解答した。膀胱により多くの MDS 細胞を生着させる方法として、MDS 細胞の投与方法を経静脈的ではなく膀胱組織に直接注入するなどの細胞投与方法の工夫が有用である可能性を解答した。また、審査委員から、発表形式が理解しやすいものであったとの印象が述べられた。

この論文は、将来の新たな医療の可能性を示しているものとして高く評価され、今後の発展により下部尿路機能障害の新たな治療法の端緒となる可能性が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の単位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。